

**Eine neue Methode  
zur klinischen Bestimmung  
des Serumbilirubins**

Rudolf Pfab

**1975**





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus der I. Medizinischen Klinik  
der Universität München

(Direktor: Prof. Dr.H.Schwiegk)

Eine neue Methode zur klinischen  
Bestimmung des Serumbilirubins

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
gesamten Medizin

verfaßt und  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
zu München

vorgelegt von

Rudolf Pfab  
aus München

1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität  
München

Berichterstatter: Prof.Dr.J.Eisenburg  
Mitberichterstatter: Prof.Dr.H.Schwiegk  
Dekan: Prof.Dr.W.Spann  
Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1975



Herrn Dr.med. M. Schmidt danke ich für die freundliche  
Überlassung des Themas und für seine wissenschaftliche  
Betreuung.



# Inhaltsverzeichnis

## I. Einleitung und Fragestellung

## II. Material und Methodik

### A Material

1. Serum
2. Chloramin T
3. Lösungen
4. Photometer

### B Methodik

1. Pufferlösungen mit verschiedenem pH
2. Wahl der Wellenlänge
3. Zeitdauer der photometrischen Messung
4. Wahl der Konzentration von Chloramin T
5. Wahl des Verdünnungsgrades von Serum zu Lösung
6. Bestimmung der Reproduzierbarkeit
7. Korrelation zwischen Chloramin T- und Diazomethode
8. Bestimmung des Umrechnungsfaktors
9. Bilirubinbestimmung mit Chloramin T als Monotest
10. Statistische Auswertung

## III. Ergebnisse

1. Anleitung zur praktischen Durchführung der  
Bilirubinbestimmung mit Chloramin T
2. Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode
3. Durchführung der Methode im Mikromaßstab
4. Tabelle zur Errechnung der Bilirubinkonzentration

## IV. Diskussion

## V. Zusammenfassung

## VI. Schrifttumsverzeichnis



## I. Einleitung und Fragestellung

Bilirubin ist das erste faßbare Umbauprodukt des roten Blutfarbstoffes Hämoglobin; gebildet wird Bilirubin im reticuloendothelialen System. Beim gesunden Menschen kommt Bilirubin im Harn nur in Spuren und im Blutserum bis etwa 1 mg% vor. Eine erhöhte Konzentration von Bilirubin in Harn und Blut weist meistens auf eine Erkrankung der Leber hin. Für den quantitativen, klinisch-chemischen Nachweis von Bilirubin wurden bisher zwei Reaktionsmechanismen angewandt:

### 1. Diazoreaktion:

Die Diazoreaktion stellt die zur Zeit fast ausschließlich angewandte Methode der quantitativen, klinischen Bilirubinbestimmung dar. Bilirubin wird nach Spaltung in Xanthobilirubin- und Neoxanthobilirubinsäure mit Diazobenzolsulfonsäure in einen Azofarbstoff von relativ hoher Stabilität übergeführt, dessen Lichtabsorption photometrisch gemessen wird; verdünntes Serum oder Harn dienen als Leerprobe. Durch Zugabe von Acceleratorsubstanzen kann neben rasch reagierendem konjugiertem Bilirubin auch unkonjugiertes Bilirubin in die entsprechenden Azofarbstoffe übergeführt werden, so daß eine Bestimmung des unkonjugierten Bilirubins neben der des Gesamtbilirubins möglich ist.

### 2. Bilirubinoxydation:

Die Oxydation von Bilirubin führt zu charakteristisch gefärbten Bilirubinoïden nach dem Prinzip der Gmelinreaktion. Durch geeignete Versuchsbedingungen bei der Bilirubinoxydation wurde versucht, zu definierten, relativ stabilen Bilirubinoïdfarbstoffen zu gelangen, deren Lichtabsorption photometrisch gemessen wurde. Eine Serum- bzw. Harnverdünnung mit chemisch unverändertem Bilirubin wurde als photometrische Leerprobe verwendet. Die Schwierigkeiten der Methode

lagen in der relativ geringen chemischen Stabilität der Bilirubinoide, sowie der Notwendigkeit einer Abzentrifugation von oxydativ denaturiertem Protein.

### 3. Eigene Fragestellung:

Die Nachteile der oxydativen Bestimmungsmethode, vor allem die geringe Genauigkeit, sowie die Notwendigkeit der Probentrifugation nach oxydativer Denaturierung und Ausfällung von Serumproteinen, führte zu einer fast vollständigen Verdrängung durch die Diazomethode.

Ausgehend von einer in unserem Labor entwickelten oxydativen Methode der Bilirubinbestimmung im Fruchtwasser wurde versucht, eine Bilirubinbestimmung im Serum mit modifizierter Methodik durchzuführen. Im Gegensatz zu den früher angewandten oxydativen Methoden wird hierbei eine Serum-Verdünnung mit oxydiertem Bilirubin als Leerprobe, und eine Serumverdünnung mit unzerstörtem Bilirubin als Meßprobe zur photometrischen Messung der Bilirubinalbuminabsorptionsbande bei 462 nm verwendet. Entsprechend der einfachen Methodik der Fruchtwasser-Bilirubinbestimmung erschien eine im Vergleich zur Diazomethode vereinfachte Bestimmung des Gesamtbilirubins möglich. Aus diesen Gründen wurde eine Untersuchung mit modifizierter "Fruchtwassermethodik" an menschlichen Seren durchgeführt.

## II. Material und Methodik

### A. Material

Bei den Versuchen, die der Ausarbeitung dieser neuen Bilirubinbestimmungsmethode dienten, wurden folgende Geräte und Chemikalien verwendet:

#### 1. Serum:

Die verwendeten Blutsera hatten zum großen Teil eine hohe Bilirubinkonzentration ( 3 - 20mg% ). Bilirubin ist im menschlichen Blut über eine Wasserstoffbrücke fest an das Albumin gebunden, wobei ein Mol Albumin ungefähr zwei Mol Bilirubin bindet. Von den Globulinen wird das Bilirubin nicht gebunden. Ein kleiner Teil des Bilirubins ist an die Erythrocytenmembran gebunden; diese Bindung ist jedoch nur möglich, wenn noch kein anderer Stoff ( z.B. ein Antikörper ) an die Erythrocytenmembran angelagert ist. Bilirubin gibt es im menschlichen Serum in zwei chemischen Formen:

- a) indirektes oder unkonjugiertes Bilirubin, das nicht mit der Glucuronsäure verestert ist und erst nach Zugabe von Alkohol oder anderen Acceleratoren eine Diazoreaktion mit Diazobenzolsulfonsäure zeigt (indirekte Diazoreaktion).
- b) direktes oder konjugiertes Bilirubin, das mit der Glucuronsäure verestert ist und ohne Alkohol- bzw. Acceleratorzugabe bereits die Diazoreaktion mit Diazobenzolsulfonsäure zeigt ( direkte Diazoreaktion ).

Durch die Bindung des Bilirubins an das Serumalbumin entsteht eine Änderung im Absorptionsspektrum. Eine alkalische, wäßrige Lösung von Bilirubin hat ein Absorptionsmaximum bei 420 - 430 nm, an Albumin gebundenes Serumbilirubin bei 450 - 470 nm. Folgende Faktoren verändern das Absorptionsspektrum des Bilirubinalbumins:

1. Bei Zugabe von Salicylsalzen, Sulfonamiden oder Elektrolyten zum Blut kann im Spektrum eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zum Langwelligen bis 470 nm, bzw. eine Verschiebung zum Kurzwelligen bis 420 nm eintreten.

2. Das Absorptionsmaximum ist pH abhängig. Eine Bilirubinalbuminlösung in 0,1 m Phosphatpuffer pH=7,38 zeigt ein Absorptionsmaximum bei 465 - 466 nm.

Das Serumbilirubin ist wegen seiner Proteinbindung relativ stabil: Serum kann längere Zeit ohne Bilirubinverlust im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Aufbewahrungszeit ist noch über 14 Tage hinaus verlängerbar bei Zugabe von Ascorbinsäure. Lichteinfall zerstört das Bilirubin; aus diesem Grund wurde das Serum immer im Dunklen aufbewahrt.

Bei den Versuchen wurden keine hämolytischen Sera verwendet, da diese die Versuchsergebnisse verfälscht hätten.

Oxy-Hämoglobin hat Absorptionsmaxima bei 577, 540 und 412 nm, reduziertes Hämoglobin bei 560 und 430 nm. Beim hämolytischen Serum besteht eine Überlagerung der Extinktionskurven von Bilirubin, Bilirubinoide, Diazoverbindungen des Bilirubins bei der Diazoreaktion und von Hämoglobin im Wellenbereich von ca. 400 - 600 nm.

Die wichtigsten Fehlerquellen der Serumbilirubinbestimmung durch die Photometrie sind:

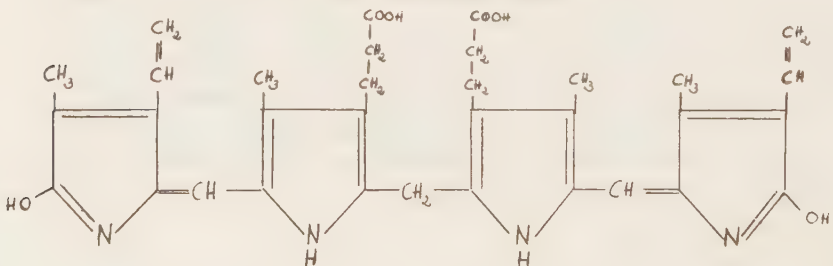
Trübung des Serums

Hämoglobinbeimengung

Carotinoide

andere Farbstoffe

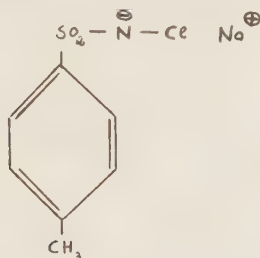
Chemische Konstitution des Bilirubins:



## 2. Chloramin T:

Als Chloramine bezeichnet man Verbindungen, in denen das Chlor direkt an den Stickstoff gebunden ist. Man kann die Chloramine als amidartige Derivate der unterchlorigen Säure auffassen.

Chemische Konstitution von Chloramin T:

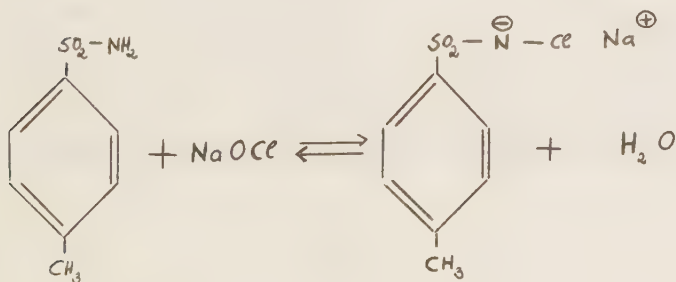


Summenformel:  $\text{CH}_3\text{.C}_6\text{H}_4\text{.SO}_2\text{NCl Na}$

Chloramin T ist das Natriumsalz von N-Chlor-p-Toluolsulfonamid. Dieses in trockenem Zustand stabile Salz ist als Antisepticum noch unter dem Namen Tosylochloramid-Natrium bekannt.

Herstellung bzw. Hydrolyse:

p-Toluolsulfonamid + Natriumhypochlorid  $\rightleftharpoons$  Chloramin T + Wasser



Chemische und physikalische Eigenschaften von Chloramin T:

Molekulargewicht: 281,699<sup>7</sup>

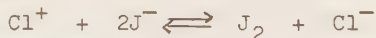
Hydrolysekonstante:  $8,0 \times 10^{-7}$

aktiver Chlorgehalt: ca. 25%

Chloramin T explodiert in entwässertem Zustand bei 175° - 180°C.

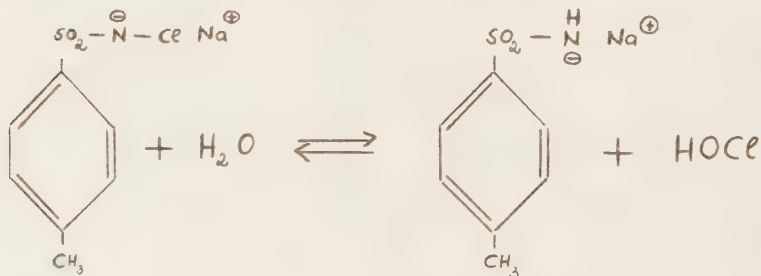
Die wäßrige Lösung von Chloramin T reagiert schwach alkalisch. Wäßrige Lösungen sind nur im Dunklen haltbar. Am Licht erfolgt Zersetzung in p-Toluolsulfonamid, p-Sulfonamidbenzolsäure und in andere Produkte. Eine Chloramin T-Lösung muß deshalb in einer lichtundurchlässigen, braunen Flasche aufbewahrt werden.

Die oxydative Wirkung des Chloramin T beruht darauf, daß das Chloramin T in wäßriger Lösung in das Sulfonamid und die unterchlorige Säure gespalten wird; unterchlorige Säure und ihre Salze sind starke Oxydationsmittel. In den Chloraminen ist das Chlor positiv geladen, entsprechend der Gleichung:



Oxydationsgleichung:

Chloramin T + Wasser                      unterchlorige Säure +  
p-Toluolsulfonamid



Die Oxydationswirkung steigt mit dem Gehalt an unterchloriger Säure; dieser wiederum ist abhängig von:

1. Konzentration des Chloramin T
2. pH-Wert: Bei einem pH von 4,5 und 25°C liegt 99,99% des Chlors als unterchlorige Säure vor ( maximaler Bereich ). Bei einem pH-Wert von 7,5 und bei 25°C liegt 50% des Chlors als unterchlorige Säure vor.
3. Hydrolysekonstante: sie nimmt mit steigender Temperatur zu.

$$K = \frac{[HOCl] \cdot [CH_3 \cdot C_6H_4 \cdot SO_2 NH]}{[CH_3 \cdot C_6H_4 \cdot SO_2 NCl]}$$

4. Wird das Chloramin T in Verbindung mit Blutserum gebracht, wird ein Teil seines Chlors vom Serumweiß gebunden und damit inaktiviert.

### 3. Lösungen:

Für die optimierte Methode wurde als Reagenz für die Darstellung der Leerprobe eine 400mg%ige Chloramin T-Lösung in 0,2 m Phosphatpuffer mit pH 7,4 verwendet; für die Meßprobe wurde nur der 0,2 m Phosphatpuffer benützt. Zu einem Volumen Serum wurden 6 Volumina Chloramin T-Lösung bzw. Puffer zugegeben; d.h. bei Normalküvetten wurden 0,4ml Serum mit 2,4ml Chloramin T-Lösung bzw. Phosphatpuffer, und bei Halbmikroküvetten 0,2ml Serum mit 1,2ml Chloramin T-Lösung bzw. Phosphatpuffer gemischt. Lösungen mit verschiedener Chloramin T Konzentration bei verschiedenen pH-Werten und unterschiedlichem Volumen (Mischungsverhältnisse mit Serum), wurden zur Optimierung der Reaktionskinetik für den klinischen Gebrauch verwendet.

#### 4. Photometer

Das Photometer ist ein Instrument zur Messung der Extinktion von Lösungen in verschiedenen Spektralbereichen. Unter der Extinktion versteht man den dekadischen Logarithmus von  $I_E/I_0$  bei einer bestimmten Wellenlänge, wobei  $I_E$  die Intensität des Lichtes nach Durchtritt durch die Lösung, und  $I_0$  die Lichtintensität vor Durchstrahlung der Lösung bedeutet. Aus der Extinktion läßt sich - bei Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes - die Konzentration einer gelösten Substanz errechnen. Das Lambert-Beersche Gesetz besagt:

"Beim Durchgang von Licht durch eine Flüssigkeit, in der eine absorbierbare Substanz gelöst ist, ist die relative Abnahme der Strahlungsintensität proportional der Konzentration der gelösten Substanz, d.h. der Zahl der absorbierbaren Teilchen, die sich im Strahlengang befinden." Die zur photometrischen Konzentrationsbestimmung geeigneten Lösungen haben in einem bestimmten Spektralbereich Absorptionsmaxima. Durch Zwischenschaltung von Filtern zwischen photometrischer Lichtquelle und Küvette sowie Verwendung von Lichtquellen mit einem Linienspektrum ( Hg ) ist es möglich, nur Licht einer bestimmten Wellenlänge durch die in der Küvette befindliche Lösung hindurchzuschicken. Für die Bilirubinbestimmung durch Messung der Bilirubinabsorptionsbande wurde ein Quecksilber-Filter für die Wellenlänge 436 nm benützt.

$$E = c \times d \times \epsilon$$

E = Extinktion ( ohne Benennung )

c = Konzentration des zu untersuchenden Stoffes  
in mol/l

d = Schichtdicke der Küvette in cm ( im vorliegenden Fall 1 )

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient in  $l/mol \times cm$

Zur Extinktionsmessung wurden ein Photometer und ein Spektralphotometer benützt:

1. Photometer mit Absorptionsmessung im Bereich von Hg-Emissionslinien ( Fa. Eppendorf ). Es wurde damit der Umrechnungsfaktor F der Chloramin T-Methode bestimmt.
2. Als Spektralphotometer wurde ein Gitter-Doppelstrahl-spektralphotometer mit Wellenlängenantrieb und angeschlossenen Schreiber zur Aufzeichnung von Extinktionskurven bzw. Extinktionsregistrierung bei gleichbleibender Wellenlänge bis über 60 Minuten verwendet ( DB-G<sup>x</sup> ).

#### B. Methodik der Gesamtbilirubinbestimmung mit Chloramin T

Wie einleitend bereits angeführt, sind 2 Reaktionsarten zur quantitativen Bilirubinbestimmung bekannt: Oxydation des Bilirubins und Umsetzung des Bilirubins mit Diazobenzolsulfonsäure.

Die Chloramin T-Methode beruht auf dem Prinzip der Oxydation. Der entscheidende Unterschied zu den herkömmlichen oxydativen Bilirubinbestimmungsmethoden liegt darin, daß der Oxydationsprozeß nicht in der Meßprobe, sondern in der Leerprobe ausgelöst wird. Während die Meßprobe nur mit 0,2m Phosphatpuffer versetzt und damit keine Reaktion ausgelöst wird, wird das Bilirubin der Leerprobe mit Chloramin T oxydiert. Die Oxydation läuft nach dem Mechanismus der Gmelin-Reaktion ab. Bereits 1826 fand Gmelin, daß bilirubinhaltige Lösungen oder Körperflüssigkeiten mit nitriethaltiger Salpetersäure ( Oxydationsmittel ) ein Farbenspiel zeigen. Dieser Reaktionsablauf wurde nach seinem Entdecker "Gmelin-Reaktion" genannt. Es entstehen

x = Fa. Beckmann, München

aus dem Bilirubin folgende charakteristisch gefärbte Dehydrierungs- bzw. Oxydationsprodukte:

Biliverdin

Glaukobilin

## Bilipurpurin

Bilicholetin

Folgende Farbbänderungen treten bei der Oxydation auf:

Gelb ( Bilirubin )

## Oxydation

Grün

Blau

violett

Rot

Orange

Gelb ( Bilicholetin )

Die Gmelin-Reaktion läßt sich an Stelle der nitritthal-  
tigen Salpetersäure auch mit dem Oxydationsmittel Chlor-  
amin T durchführen.

Bei einer photometrischen Bestimmung wird die Extinktion einer Meßprobe gegen diejenige einer Leerprobe gemessen. Dabei ist es wichtig, daß die Leer- und Meßprobe während der Messung konstante Extinktionen haben, und daß andererseits immer während derselben Reaktionsphase gemessen wird. Im vorliegenden Fall betraf diese Problematik nur die Leerprobe, da in der Meßprobe keine Reaktion ausgelöst wurde.

Die Versuche zielten nun dahin, das Bilirubin der Leerproube oxydativ abzubauen und diesen Oxydationsvorgang bei bestimmten Konzentrationsverhältnissen so zu steuern, daß über relativ lange Zeit ( ca. 5 - 60 min ) im Bereich der Bilirubinabsorptionsbande eine konstante Extinktion erzielt wird.

Bei Vorversuchen wurde die Reaktion von dem Oxydationsmittel Chloramin T auf das Bilirubinalbumin untersucht. Es wurde dazu eine 5%ige Chloramin T-Lösung in 0,9%iger

NaCl-Lösung angesetzt. Ein Normalserum wurde mit unkonjugiertem Bilirubin angereichert. Es wurde hierzu unkonjugiertes Bilirubin in 0,05n NaOH gelöst, Serum dazugefügt und diese Lösung mit 0,05n HCl neutralisiert, wobei die Volumina von NaOH und HCl gleich groß waren. Diese Bilirubinalbuminlösung wurde in unterschiedlichen Konzentrationen zum Normalserum gegeben. Ein Volumen Serum wurde mit 6 Volumina Chloramin T-Lösung gemischt. Die Extinktionsmessung erfolgte in einem Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 436nm gegen Luft; Chloramin T bewirkte einen Extinktionsabfall der Bilirubinalbuminlösung, der über ein Plateau in einen Extinktionsanstieg ( Fällungen, Bilicholestinextinktion ) überging und einer Farbänderung von gelb zu grün zu rot zu gelb entsprach.

Das Ziel war ein schneller Extinktionsabfall am Anfang der Reaktion und anschließend eine für längere Zeit ( ungefähr eine Stunde ) konstante Extinktion. Dieses Ziel konnte bei den Vorversuchen durch Änderungen der Chloramin T-Konzentrationen und der Verdünnungen nicht in ausreichendem Umfang erreicht werden. Es wurde deshalb zur Optimierung der Reaktionsbedingungen die Bedeutung folgender Faktoren untersucht:

1. pH - Wert
2. Wellenlänge der Hg - Filter
3. Reaktionszeit
4. Zusammensetzung der Reagenzlösungen
5. Verdünnungsgrad des Serums
6. Reproduzierbarkeit
7. Korrelation zwischen der Chloramin T- und der Diazomethode
8. Umrechnungsfaktor zur Konzentrationsbestimmung
9. Bilirubinbestimmung mit Chloramin T als Monotest
10. Statistische Auswertung

## 1. Pufferlösungen mit verschiedenem pH

Die oxydative Zerstörung des Bilirubins wird bei der Chloramin T-Methode durch die unterchlorige Säure bewirkt. Die Konzentration der unterchlorigen Säure hängt vorwiegend von der Konzentration an Chloramin T und vom pH-Wert der jeweiligen Lösung ab. Bereits eine geringfügige pH-Verschiebung der Lösung bewirkt eine große Änderung des Gehalts an unterchloriger Säure. Welcher Anteil des Gesamtchlors im Chloramin T bei einem bestimmten pH-Wert als unterchlorige Säure vorliegt, zeigt die folgende Tabelle:

|           |                         |
|-----------|-------------------------|
| pH = 6,8: | 82% unterchlorige Säure |
| pH = 8,0: | 24% unterchlorige Säure |
| pH = 7,4: | 56% unterchlorige Säure |

Da ein mittelschneller Oxydationsverlauf des Bilirubins erreicht werden sollte ( Extinktionsplateau ), mußte die geeignete Konzentration an unterchloriger Säure, und damit auch der günstigste pH-Wert gefunden werden. Es wurden folgende Pufferlösungen in mehreren Versuchsreihen getestet:

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| 0,1m Acetatpuffer        | pH = 5,4 |
| 0,1m Barbitol-HCl-Puffer | pH = 6,8 |
| 0,1m Veronal-HCl-Puffer  | pH = 6,8 |
| 0,2m Phosphatpuffer      | pH = 7,4 |
| 0,1m Phosphatpuffer      | pH = 7,6 |
| 0,2m Tris-HCl-Puffer     | pH = 8,0 |

Als für diesen Zweck am besten geeignet erwies sich der 0,2m Phosphatpuffer mit pH 7,4. Bei einer relativ geringen Chloramin T-Konzentration ( 400mg% ) läßt sich mit diesem Puffer ein mittelschneller Oxydationsverlauf erzielen, bei dem in den ersten 10 Minuten der stärkste Extinktionsabfall erfolgt. Man bekommt eine konstante Extinktion bei ca. 436nm ungefähr zwischen der 10. und 60. Minute.

Ein weiterer Vorteil dieses Puffers liegt in seinem physiolo-

gischen pH-Wert, so daß durch ihn sicher keine störenden Nebenreaktionen im Blutserum ausgelöst werden. Die anderen Pufferlösungen zeigen zu hohe bzw. zu niedrige pH-Werte. Die Oxydation verläuft entweder sehr träge oder sehr schnell, was sich durch Änderung der Chloramin T-Konzentration in der Pufferlösung nicht voll korrigieren läßt. Chloramin T ist außerdem in einigen der verwendeten Pufferlösungen schlecht lösbar.

Abbildung 1 zeigt den zeitlichen Reaktionsverlauf der Bilirubinoxidation bei verschiedenen pH-Werten:

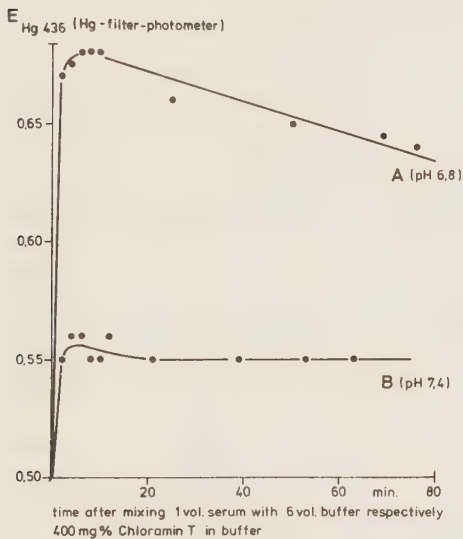


Abb. 1

Die Molarität des Phosphatpuffers von 0,2 gewährleistet eine sehr gute Pufferung; auch bei stark acidotischen oder alkalischen Sera ergab sich nur eine maximale pH-Verschiebung von  $\pm 0,03$ .

## 2. Wellenlänge bei der photometrischen Messung mit Hg-Linienphotometern

Das Absorptionsmaximum des Bilirubinalbumins, gelöst in einer 0,2m Phosphatpuffer-Lösung mit einem pH von 7,4 ( pH des Gemisches 7,38 ), liegt bei ca. 462 nm. Es wurde hierbei die Extinktionskurve einer Mischung von 1 Volumen Serum mit 6 Volumina 0,2m Phosphatpuffer pH 7,4 gegen H<sub>2</sub>O als Leerprobe mit dem registrierenden Spektralphotometer DB-G aufgezeichnet. ( Abb. 2 )

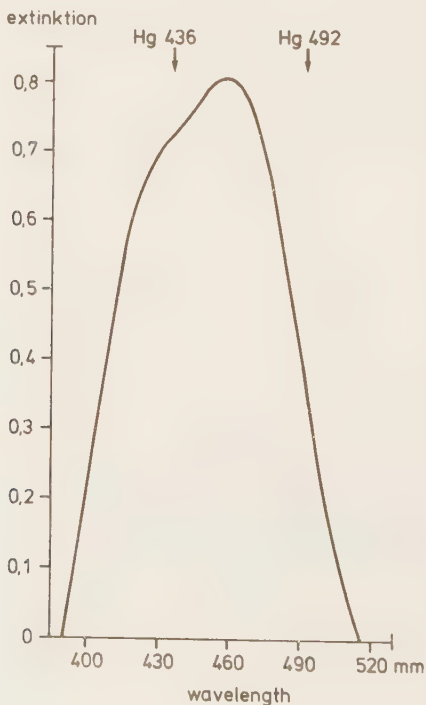


Abb. 2 Extinktionskurve des Bilirubinalbumins

Die Lage des Extinktionsmaximums kann durch Zugabe großer Mengen an Salicylsalzen, Sulfonamiden, Elektrolyten, sowie durch pH-Verschiebung oder durch starke Temperaturänderung beeinflußt werden.

Aus der Serie der Hg-Linienfilter kamen, entsprechend der Lage des Extinktionsmaximums, für die Bilirubinbestimmungsmethode mit Chloramin T nur die Filter für die Wellenlänge 436 und 492 nm in Frage ( Hg 436 und Hg 492 ).

Aus der Extinktionskurve ist ersichtlich, daß die Extinktion bei 436 nm wesentlich höher ist als bei 492nm. Nach der Formel: Extinktion  $E \times$  Umrechnungsfaktor  $F =$  Konzentration  $c$  gilt: Je kleiner die Extinktion ist, desto größer ist der Umrechnungsfaktor. Da jedoch die Genauigkeit der Chloramin T-Methode im Normalbereich bzw. Bereich leichter Bilirubin-erhöhung mit sinkender Extinktion abnimmt, liegt hierin ein entscheidender Nachteil für den Filter Hg 492nm. Für diesen Zweck ist es somit günstig, die Bilirubinextinktion bei der Wellenlänge 436 nm zu messen. Bei dieser Wellenlänge ist es jedoch nicht möglich, den Bilirubingehalt von hämolytischen Sera exakt zu bestimmen. Es kommt zu einer Überlagerung der Extinktionen von Bilirubinalbumin und Hämoglobin und damit zu einer Veränderung der Extinktionshöhe des Bilirubin-albumins.

Andere Bilirubinoide stören nicht, da sie im Serum als Oxydationsprodukte des Bilirubins nur in Spuren vorkommen und folgende Absorptionsmaxima haben:

|               |              |
|---------------|--------------|
| Biliverdin:   | 640 - 680nm  |
| Glaukobilin:  | 670 nm       |
| Bilipurpurin: | 619 - 622 nm |
| Bilicholetin: | 622 nm       |

### 3. Zeit nach Reaktionsbeginn bis zur photometrischen Messung und Dauer der photometrischen Messung

Als optimaler zeitlicher Bereich für die photometrische Messung wurde der Zeitraum von ca. 5-60 Minuten nach

Mischung von Serum und Reagenzlösungen angestrebt. Innerhalb dieses Zeitraumes sollte die Extinktion weitgehend konstant bleiben, was eine "mittelschnelle" Oxydationsgeschwindigkeit des Bilirubins der Leerprobe erforderte. Um zu bestimmen, wieviel Zeit für eine Messung benötigt wird, und ab wann die Messung begonnen werden kann, wurden 25 Proben gleichzeitig angesetzt. Bei mittlerer Arbeitsgeschwindigkeit, entsprechend der durchschnittlichen Leistung einer geübten med.-techn. Assistentin, wurden ungefähr 10 Minuten benötigt, um die Sera und Pufferlösungen bzw. gepufferten Chloramin T-Lösungen zu pipettieren. Zur Pipettierung von Pufferlösung bzw. gepufferter Chloramin T-Lösung wurden automatische Pipetten mit einstellbarem Pipettiervolumen ( Zipette ) bzw. eine 0,2 ml Marburg-Pipette für die Serumpipettierung verwendet. Die photometrische Messung dauerte etwa 50 Minuten (Eppendorf-Photometer, Halbmikroabsaugeküvette ).

#### 4. Konzentration von Chloramin T

Bei den Versuchen wurde das Chloramin T in Konzentrationen von 200mg% bis 1g% in 0,2m Phosphatpuffer gelöst; das pH betrug 7.4, das Volumenverhältnis von Serum und Puffer 1 : 6, die Wellenlänge 436nm. Für die photometrische Messung des zeitlichen Extinktionsverlaufes bei 436nm wurde der Spektralphotometer DG-B mit Schreiber ( 5 Zoll/h ) verwendet. Relativ hohe oder relativ niedrige Chloramin T-Konzentrationen bewirkten eine zu schnelle bzw. zu langsame Oxydationsreaktion durch eine zu schnelle bzw. zu langsame Zerstörung des Bilirubins der Leerprobe. In bestimmten Zeitabständen wurde die Extinktion der Meßprobe gegen die Extinktion der Leerprobe gemessen und dieser Extinktionswert als Ordinate gegen die Zeit als Abszisse ist ein Diagramm eingetragen ( Abb. 3 ).

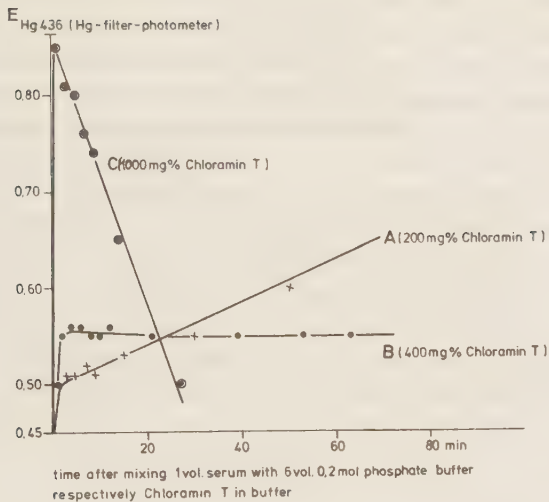


Abb. 3 zeitlicher Reaktionsverlauf der Bilirubin=oxydation bei verschiedenen Chloramin T-Konzentrationen

Bei einer zu hohen Chloramin T-Konzentration in der Lösung kommt es zu einem schnellen, maximalen Anstieg der Extinktion und einem nachfolgenden raschen Extinktionsabfall. Bei einer zu niedrigen Chloramin T-Konzentration steigen die Extinktionswerte nur sehr langsam an und erreichen erst relativ spät das Maximum. Als günstigste Konzentration

von Chloramin T im Phosphatpuffer erwies sich 400mg%. Es war damit eine sehr gute Kombination aus Puffer-pH und Chloramin T-Konzentration gefunden worden; beide beeinflussen die Oxydationsgeschwindigkeit. 30 Hepatitis-Sera wurden mit einer 400mg%igen Chloramin T-Lösung in 0,2m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 versetzt. Das Verhältnis von Serum zu Lösung betrug 1 : 6, die Wellenlänge 436nm. Diese 30 Leerproben wurden gegen 30 Meßproben, die nur die Sera und den Phosphatpuffer enthielten, gemessen. Die Extinktionskurven - mit einem Spektralphotometer aufgezeichnet - liefen zwischen der 10. und der 60. Minute fast vollkommen waagrecht, d.h. es kam während dieser Zeit zu keiner signifikanten Extinktionsänderung. Bei 15 Proben betrug der maximale Extinktionsunterschied zwischen der 10. und der 60. Minute 0,01, bei 15 Proben 0,02.

#### 5. Verdünnungsgrad

Bei der Wahl des Verdünnungsgrades von Serum zu Lösung mußten 2 Faktoren berücksichtigt werden:

a) Ein Teil des Chlors im Chloramin T wird an das Serumalbumin gebunden und damit inaktiviert. Es muß somit das Chloramin T immer im Überschuß in der Meßlösung vorhanden sein, damit die Oxydationsgeschwindigkeit des Bilirubins nicht von der Konzentration des Albumins abhängt.

b) Bei einer zu starken Verdünnung der Meßlösung nimmt die Extinktionshöhe der Bilirubinabsorptionsbande ab. Bei zu niedriger Extinktion wird jedoch der Meßfehler der Extinktionsmessung relativ hoch. Es galt auch hier wieder einen möglichst günstigen Mittelweg zu finden. In mehreren Versuchsreihen wurden Verdünnungsgrade von 1 : 2 bis 1 : 10 ( Serum : Lösung ) getestet; das Verhältnis von 1 : 6 erwies sich als günstigstes.

Bei diesem Wert wurde die Oxydationsgeschwindigkeit des

Bilirubins auch durch größere Schwankungen der Albuminkonzentration nicht beeinflusst, und der Umrechnungsfaktor betrug ungefähr 11,0.

Da das Serum mit einer 400mg% Chloramin T-Lösung im Verhältnis 1 : 6 versetzt wurde, betrug die Konzentration des Chloramin T in der Meßlösung 342,6mg%.

#### 6. Reproduzierbarkeit

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Chloramin T-Methode wurden in 25 Reagenzgläser mit 5ml Stangenpipetten je 2,4ml 0,2m Phosphatpuffer pH 7,4 und in 25 weitere Reagenzgläser je 2,4ml 400mg% Chloramin T-Lösung in 0,2m Phosphatpuffer pH 7,4 einpipettiert. Aus einem Gefäß mit ca. 25 ml ikterischem Serum wurden in jedes Reagenzglas je 0,4ml Serum mit einer 0,2ml Marburg-Pipette ( zweimalige Pipettierung/Glas ) zugegeben und kurz geschüttelt; Dauer der Einpipettierung insgesamt ca. 10 Minuten. Anschließend erfolgte bei Filter Hg 436 eine Messung der Extinktion von Meßproben gegen Leerproben. Die Messung erfolgte 10 - 60 Minuten nach Mischung von Serum und Lösungen.

Bei Extinktionswerten von 0,355 - 0,375 betrug der Mittelwert 0,364. Die statistischen Auswertungen ergaben eine Standardabweichung von 0,005, einen Variationskoeffizient von 1,37%, eine Standardabweichung des Mittelwertes von 0,001 und einen prozentualen Fehler von 0,28%.

#### 7. Korrelation zwischen Chloramin T-Methode und Diazomethode

Um die Straffheit der Korrelation zwischen der Chloramin T-Methode und der Diazomethodik zu bestimmen und eventuelle systematische Abweichungen von Einzelproben oder Abweichungen in bestimmten Konzentrationsbereichen zu erkennen, wurden bei 50 Serumproben die Diazomethode nach Jendrassik und Grof, und die Chloramin T-Methode durchgeführt. Bestimmung des Spearmannschen Korrelationskoeffizienten und der Regressionsgerade.

### 8. Umrechnungsfaktor F

Der Umrechnungsfaktor wurde nach Anlegung von 3 Eichkurven als Mittelwert der sich bei der Eichung ergebenden Umrechnungsfaktoren bestimmt.

#### a) Eichkurve mit Bilirubinzugabe zu bilirubinfreiem Serum

80 mg Bilirubin wurden in 5ml 0,1n NaOH gelöst. Zugabe von 100 $\mu$ l Bilirubinlösung zu 8300 $\mu$ l bilirubinfreiem Serum ( Sonnenlichtexposition ); Neutralisation mit 100 $\mu$ l 0,1n HCl ergibt Serum mit 40mg% Bilirubin. Durch Verdünnen des Serums mit bilirubinfreiem Serum wurden Sera mit 2, 4, 8, 10, 20, 30 und 40mg% dargestellt und die Extinktion mit der Chloramin T-Methode bestimmt. Zeichnung der Eichkurve; Berechnung der Regressionsgerade und des Umrechnungsfaktors F ( Abb. 4 ).

#### b) Eichkurve mit dem Kontrollserum "Bilirubin Control"

Nr.BIC-924 der Fa. Dade<sup>x</sup>

Durch Verdünnung des Kontrollserums ( 19,6 mg% Bilirubin ) mit bilirubinfreiem Serum, wurden Sera im Konzentrationsbereich von 19,6 mg% - 2,45 mg% dargestellt. Anfertigung der Eichkurve, sowie Bestimmung des Umrechnungsfaktors F wie bei a) ( Abb. 5 ).

#### c) Eichkurve durch Vergleich mit der Diazomethode

Bestimmung der Bilirubinkonzentration einiger Sera im Konzentrationsbereich von 0,75 - 19,5 mg% mit der Diazomethode nach Jendrassik und Grof, entsprechend der Testpackung "Merckotest Bilirubin" der Fa. E. Merck ( Darmstadt ):

|               | Analyse   | Blindprobe |
|---------------|-----------|------------|
| Sulfanilsäure | 0,2 ml    | 0,2 ml     |
| Natriumnitrit | 1 Tropfen | -----      |
| Accelerator   | 1,0 ml    | 1,0 ml     |
| Serum         | 0,2 ml    | 0,2 ml     |

<sup>x</sup> Fa. Dade Miami USA

Mischen, 10 - 60 Minuten bei Raumtemperatur ( 20°-30°C ) stehen lassen

|                   |        |        |
|-------------------|--------|--------|
| Fehling-II-Lösung | 1,0 ml | 1,0 ml |
|-------------------|--------|--------|

Mischen, nach 5 - 30 Minuten die Extinktion der Analyse gegen die Extinktion der Blindprobe messen

Nach Bestimmung der Extinktion dieser Sera mit der Chloramin T-Methode, Anlegung der Eichkurve und Bestimmung des Umrechnungsfaktors F ( Abb. 6 ).

#### 9. Gesamtbilirubinbestimmung mit Chloramin T als Monotest

Die Gesamtbilirubinbestimmung mit Chloramin T kann auch nach dem Prinzip des "Monotestes" durchgeführt werden. Für die Arztpraxis ist dieses Verfahren sehr empfehlenswert, da sich dort das Anschaffen der automatischen Ansaugpipetten, der Chloramin T-Lösung und des Phosphatpuffers finanziell oft nicht lohnt. Für die Klinik liegt der Vorteil des Monotestes in einer weiteren deutlichen Zeitersparnis gegenüber dem normalen Bestimmungsverfahren mit Chloramin T. Es wurde der Gesamtbilirubingehalt von 20 ikterischen Sera nach dem Prinzip des Monotestes bestimmt, um festzustellen, wieviel Zeit dafür bei durchschnittlicher Arbeitsgeschwindigkeit benötigt wird. Es wurde folgende Monotestpackung zusammengesetzt, wie sie eventuell von einer pharmazeutischen Fabrik hergestellt werden könnte:

In kleine Fläschchen, die durch leicht abziehbare Gummistöpsel verschlossen waren, wurden 2,4 ml der Chloramin T-Lösung bzw. des Phosphatpuffers einpipettiert. In einer Schachtel wurden 10 Fläschchen mit der Chloramin T-Lösung für die Leerprobe und 10 Fläschchen mit dem 0,2m Phosphatpuffer pH 7,4 für die Meßprobe dunkel verpackt. Eine Packung reichte somit für 10 Bilirubinbestimmungen; es wurde noch eine zweite hergestellt, um die 20 Bilirubinbestimmungen

durchführen zu können. Für die Durchführung der Methode wurde die benötigte Zeit bestimmt:

Numerierung der 20 Serumgläser, Öffnung der Monotestpackung, Herausnahme der Fläschchen mit den Lösungen und deren Numerierung, Einpipettieren von jeweils 0,4 ml Serum in die Meß- und Leerprobe mit Auswechseln der Pipettenspitzen ( 0,2ml Marburg-Pipette ). Im Anschluß an das Pipettieren, für das ca. 10 Minuten benötigt wurde, wurde mit der photometrischen Messung begonnen. Es wurde ein Eppendorf-Photometer mit einem Hg-Filter 436 nm verwendet. Als Küvette wurde eine Halbmikroabsaugküvette benützt. Mit der Lösung der Leerprobe wurde das Gerät auf 0 geeicht und mit der entsprechenden Lösung der Meßprobe wurde der Extinktionswert abgelesen.

#### 10. Statistische Auswertung von Versuchen.

a) Bestimmung des Korrelationskoeffizienten zwischen der Chloramin T-Methode und der Diazomethode nach Jendrassik und Grof:

Bei 50 Proben wurde mit der Diazomethode die Gesamtbilirubinkonzentration  $c$  bestimmt und entsprechend der Extinktion  $E_{\text{Chl T}}$  der Chloramin T-Methode ( Eppendorf-Photometer ) der Korrelationskoeffizient berechnet ( Abb. 7 ). Bei 24 Proben erfolgte entsprechend die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten mit dem Spektralphotometer ( 436nm; ).

b) Bei 12 Serumproben erfolgte ein Vergleich der Extinktionen der Chloramin T-Methode bei Messung mit Halbmikroküvetten ( 4mm innere Breite ) und Normalküvetten ( 1 cm innere Breite ); die Extinktionsdifferenzen wurden mit dem Wilcoxon-test für Paardifferenzen auf Signifikanz geprüft.

c) Bei der Bestimmung des Umrechnungsfaktors wurde entsprechend den Eichkurven, der Umrechnungsfaktor  $F$  zwischen Konzentration und Extinktion durch die mit einem Olivetti-Tischcomputer berechneten Eichkurven festgelegt.

### III. Ergebnisse

Nach den Teilergebnissen der Untersuchung der Bilirubin-oxydation mit Chloramin T-Lösungen im verdünnten Serum unter Variation von pH-Wert, Wellenlänge, Reaktionszeit, Zusammensetzung der Reagenzlösungen und Verdünnungsgrad des Serums wurde eine optimierte Methodik ausgearbeitet, die den Erfordernissen der klinischen Labordiagnostik angepaßt ist.

1. Die praktische Durchführung der Gesamtbilirubinbestimmung mit Chloramin T ergibt sich aus nachfolgendem Schema:

In Reagenzgläser pipettieren:

|                                                               | Meßprobe      | Leerprobe     |
|---------------------------------------------------------------|---------------|---------------|
| 400mg% Chloramin T-Lösung<br>in 0,2m Phosphatpuffer<br>pH 7,4 | -----         | 2,4ml (1,2ml) |
| 0,2m Phosphatpuffer<br>pH 7,4                                 | 2,4ml (1,2ml) | -----         |
| Serum                                                         | 0,4ml (0,2ml) | 0,4ml (0,2ml) |

Mischen, nach 20 - 60 Minuten die Extinktion der Meßprobe gegen die Extinktion der Leerprobe messen ( Raumtemperatur 20° - 30°C ).

Hg - Filter: 436nm                      Schichtdicke der  
Spektralphotometer: 436nm              Küvette: 1cm

Volumenangaben in Klammern gelten für Halbmikroküvetten

#### Berechnung:

Gesamtbilirubinkonzentration =  $E \times F$  ( mg/100ml )

F für Eppendorf-Photometer:

( Hg 436nm )

11,3

F für Spektralphotometer:

( 436nm )

Die Lösungen müssen in einem braunen Behälter aufbewahrt werden. Ihre Haltbarkeit beträgt ungefähr ein halbes Jahr bei Zimmertemperatur und bei Schutz vor direktem Sonnenlicht.

Als Pipetten werden am besten eine Marburg-Pipette für 0,2ml und zwei Pipettierautomaten verwendet.

Bei Abfüllung von Chloramin T-Lösung und Pufferlösung in Braunglasfläschchen ( ca. 5ml Volumen ), entsprechend Testpackungen, ergeben sich Vorteile durch Reduzierung der Pipettierarbeit auf die Einpipettierung von Serum.

## 2. Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode:

Die zur Bestimmung der Richtigkeit der Methode angefertigten Eichkurven mit Zugabe von Bilirubinlösung zu bilirubinfreiem Serum, Verdünnung von Kontrollserum mit bilirubinfreiem Serum, sowie Vergleich von Extinktion der Chloramin T-Methode und mit der Diazomethode bestimmter Konzentration, ergaben eine sehr enge Korrelation. Die entsprechend den Regressionsgeraden bestimmten Umrechnungsfaktoren von 11,5, 11,5 bzw. 10,8 ergaben den bei der Methode verwendeten gemittelten Umrechnungsfaktor von 11,3. Die Lage der Eichgeraden und die Korrelationsfaktoren können den Abbildungen 4 - 8 entnommen werden; die Eichgeraden gehen durch den Nullpunkt.

Bei den zur Ermittlung des Umrechnungsfaktors  $F$  für den Eppendorf-Photometer verwendeten Serumproben wurde der Spearmannsche Korrelationskoeffizient  $R_s$  zwischen der Extinktion der Chloramin T-Methode (  $E_{\text{Chl T}}$  ) und der Gesamtbilirubinkonzentration der Diazomethode (  $c$  ) errechnet ( Abb. 4 ).  $R_s = 0,9992$  und ist hoch signifikant gegen Null (  $p < 0,001$  ).

Die bei 25 identischen Serumproben unter Verwendung einer automatischen Pipette durchgeführte Bilirubinbestimmung

mit der Chloramin T-Methode ergab bei einem Extinktionsmittelwert von 0,364 einen Variationskoeffizient von 1,37%.

### 3. Zur Durchführung der Methode im Mikromaßstab

Bei der Extinktionsmessung identischer Proben mit Normal- und Halbmikroküvetten ( Eppendorf-Photometer Hg 436nm ) betrug die mittlere Extinktionsdifferenz 0,010. Mit dem Wilcoxentest für Paardifferenzen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Entsprechend der geringen nicht signifikanten Extinktionsdifferenz kann deshalb wahlweise auch eine Mikromethode, z.B., mit 0,1ml Serum und 0,6ml Reagenz durchgeführt werden.

4. Die Bestimmung der Bilirubinkonzentration kann auch an Hand der folgenden Tabelle erfolgen:

| Bil.               |      | Bil.               |       | Bil.               |       |
|--------------------|------|--------------------|-------|--------------------|-------|
| E <sub>Chl T</sub> | mg%  | E <sub>Chl T</sub> | mg%   | E <sub>Chl T</sub> | mg%   |
| 0,01               | 0,11 | 0,32               | 3,62  | 0,95               | 10,74 |
| 0,02               | 0,23 | 0,34               | 3,84  | 1,0                | 11,3  |
| 0,03               | 0,34 | 0,36               | 4,07  | 1,05               | 11,87 |
| 0,04               | 0,45 | 0,38               | 4,29  | 1,1                | 12,43 |
| 0,05               | 0,57 | 0,4                | 4,52  | 1,15               | 13,0  |
| 0,06               | 0,68 | 0,42               | 4,75  | 1,2                | 13,56 |
| 0,07               | 0,79 | 0,44               | 4,97  | 1,25               | 14,13 |
| 0,08               | 0,9  | 0,46               | 5,2   | 1,3                | 14,7  |
| 0,09               | 1,02 | 0,48               | 5,42  | 1,35               | 15,26 |
| 0,1                | 1,13 | 0,5                | 5,65  | 1,4                | 15,82 |
| 0,11               | 1,24 | 0,52               | 5,88  | 1,45               | 16,39 |
| 0,12               | 1,37 | 0,54               | 6,1   | 1,5                | 17,0  |
| 0,13               | 1,47 | 0,56               | 6,33  | 1,55               | 17,52 |
| 0,14               | 1,58 | 0,58               | 6,55  | 1,6                | 18,08 |
| 0,15               | 1,7  | 0,6                | 6,78  | 1,65               | 18,65 |
| 0,16               | 1,81 | 0,62               | 7,01  | 1,7                | 19,21 |
| 0,17               | 1,92 | 0,64               | 7,23  | 1,75               | 19,78 |
| 0,18               | 2,03 | 0,66               | 7,46  | 1,8                | 20,34 |
| 0,19               | 2,15 | 0,68               | 7,68  | 1,85               | 20,91 |
| 0,2                | 2,26 | 0,7                | 7,91  | 1,9                | 21,47 |
| 0,21               | 2,37 | 0,72               | 8,14  | 1,95               | 22,04 |
| 0,22               | 2,49 | 0,74               | 8,36  | 2,0                | 22,6  |
| 0,23               | 2,6  | 0,76               | 8,59  | 2,05               | 23,17 |
| 0,24               | 2,71 | 0,78               | 8,81  | 2,1                | 23,73 |
| 0,25               | 2,83 | 0,8                | 9,04  | 2,15               | 24,3  |
| 0,26               | 2,94 | 0,82               | 9,23  | 2,2                | 24,86 |
| 0,27               | 3,05 | 0,84               | 9,49  | 2,25               | 25,43 |
| 0,28               | 3,16 | 0,86               | 9,72  | 2,3                | 26,0  |
| 0,29               | 3,28 | 0,88               | 9,94  | 2,4                | 27,11 |
| 0,3                | 3,39 | 0,9                | 10,17 | 2,5                | 28,24 |

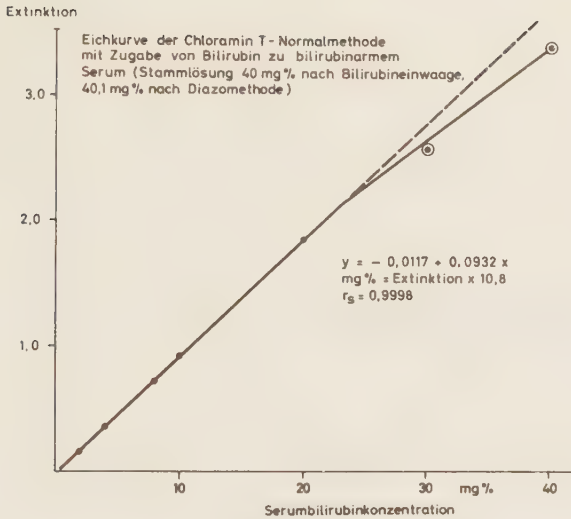


Abb. 4 Eichkurve mit Bilirubinzugabe zu bilirubin =  
freiem Serum

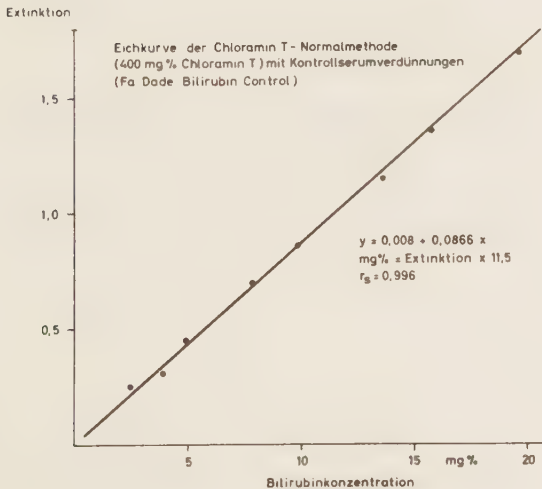


Abb. 5 Eichkurve mit dem Kontrollserum "Bilirubin  
Control"

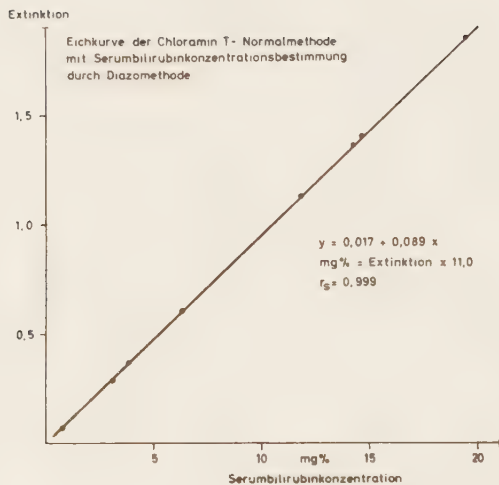


Abb. 6 Eichkurve durch Vergleich mit der Diazomethode

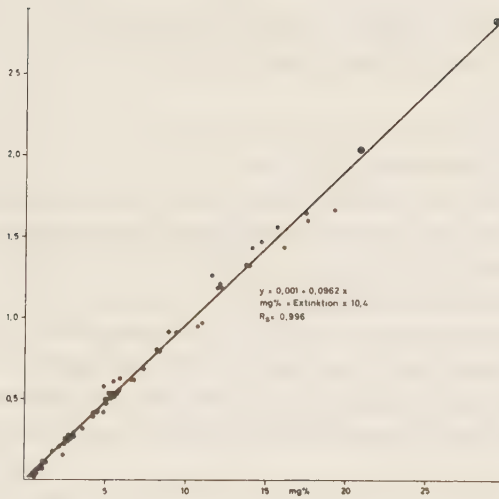


Abb. 7 Abszisse: Gesamtbilirubinkonzentration  
( Diazomethode )

Ordinate: Extinktion des Gesamtbilirubins  
( Chloramin T-Methode )

#### IV. Diskussion

Die Chloramin T-Methode der Bilirubinbestimmung erbringt im Vergleich zur Diazomethode einige wesentliche Vorteile, vor allem durch die einfache Arbeitstechnik eine starke Reduzierung der Arbeitszeit bis zur photometrischen Messung.

Als Vorteile der Chloramin T-Methode gegenüber der Diazomethode zur Bestimmung des Gesamtbilirubins im Blutserum sind zu nennen.

1. Zeitdauer für das Ansetzen der Reagenzien ca.  $1/4$  derjenigen der Diazomethode.
2. Verwendung von nur 2 Reagenzien, bei der Diazomethode 9 Reagenzien; entsprechend wesentlich niedrigere Kosten der Reagenzien.
3. Nach Einpipettierung des Serums nur 2, bei der Diazomethode 6 Pipettierungen pro Probe; entsprechend niedrigere Volumenfehler und geringere Arbeitszeit.
4. Photometrische Messung bereits nach 10 - 20 Minuten möglich, bei der Diazomethode erst nach ca. 25 Minuten.

Als Nachteil dieser Methode gegenüber der Diazomethode ist zu nennen, daß mit der Chloramin T-Methode nur das Gesamtbilirubin bestimmt werden kann, während die Diazomethode auch eine Bestimmung des indirekten Bilirubins zuläßt.

Anderen oxydativen Bestimmungsmethoden des Gesamtbilirubins, z.B. der  $\text{FeCl}_3$ -Methode gegenüber, erweist sich die Chloramin T-Methode durch Genauigkeit, gute Reproduzierbarkeit, geringem materiellem Aufwand, und in der Schnelligkeit der Durchführung überlegen.

#### V. Zusammenfassung

Es wurde eine Methode zur Bestimmung des Gesamtbilirubins im Blutserum entwickelt, die auf der photometrischen Mes-

sung der Bilirubinalbuminabsorptionsbande von verdünntem Serum bei 462nm gegen bilirubinfrei gemachte Serumverdünnung beruht. Die Chloramin T-Methode bringt eine wesentliche Einsparung an Material, Arbeit und Zeit gegenüber anderen Methoden mit sich. Wegen ihrer Einfachheit und Schnelligkeit eignet sie sich sehr gut neben der klinischen Anwendung auch zur Verwendung im kleinen Praxislaboratorium.

### Summary

A method to determine the total bilirubin in the blood serum has been developped. It ist based on the photometric measurement of the bilirubinalbuminabsorptionsband of dilute serum at 462 against a serum dilution which is made free of bilirubin. The chloramin T-method involves real savings of material, work and time in facing other methods. On account of its simplicity and quickness it is also very well qualified for use in small surgery laboratories in addition to its clinical use.

## VI Schrifttumsverzeichnis

1. Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie  
Urban & Schwarzenberg  
München - Berlin 1954  
Band 5 S. 382 - 388 "Chloramine"
2. Kirk-Othmer Encyclopedia of chemical technology  
John Wiley & Sons 1964  
Band 4 S. 908 - 928  
"Chloramines and chloroamines"
3. Beilstein Handbuch der Organischen Chemie  
Band 11 S. 107  
ergänzende Bände: 11 I S. 29; 11 II S. 62; 11 III S. 300
4. Torben K. With Bile Pigments  
Abschnitt V S. 259 - 489
5. Hoppe-Seyler/Thierfelder  
Handbuch der physiologisch- und pathologisch - chemischen  
Analyse  
Band IV Teil 2 S. 942 - 980
6. Sachs, L.  
Statistische Auswertungen  
Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York ( 1971 )
7. Persönliche Mitteilungen der Fa. Merck

Lebenslauf

Am 8. September 1949 wurde ich als Sohn des Dr. Rudolf Pfab, von Beruf Senatspräsident, und dessen Ehefrau Rita, geb. Schottenheim, in München geboren.

Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Grundschule in München, von 1960 bis 1969 das Neusprachliche Gymnasium in Icking, wo ich am 28. Juni 1969 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1970 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität München.

Die Naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich nach dem Wintersemester 1970/71 ab, die ärztliche Vorprüfung bestand ich vollständig am 18. Oktober 1972.

Am 17. Dezember 1975 beendete ich mein Medizinstudium nach Ablegung des Staatsexamens.

Am 30. Juni 1975 heiratete ich Frau Ursula Pfab, geb. Schulte-Uebbing.

Rudolf Pfab









